

## 高機能スプラウトの開発 (第3報)

### — ガーデンクレススプラウトの脂質代謝調節効果 —

横山慎一郎、小寺美有紀、平井晶子\*、中田光彦\*\*、上野有紀\*\*\*、大澤俊彦\*\*\*

#### Development of Advanced Sprout (III)

#### — Lipid Metabolism Regulating Effect by Garden Cress Sprout —

Shin-ichiro YOKOYAMA, Miyuki KODERA, Akiko HIRAI\*, Mitsuhiko NAKADA\*\*, Yuki UENO\*\*\*  
and Toshihiko OSAWA\*\*\*

ガーデンクレススプラウトの摂取による健康影響について明らかにするために、ガーデンクレススプラウト乾燥粉末(GC、0.01~0.05%w/w)摂取マウスによる生理作用について検証した結果、コントロール群に比して0.05%(w/w)GC添加群において有意な体重および肝臓重量減少が認められた。一方、絶食後に摘出した肝臓重量では差は認められなかった。肝臓中の総脂質および中性脂肪量においては、GC添加群で有意な減少が見られた。血液マーカーでは差が見られないものの、絶食後に採血した場合では、ALT、中性脂肪および遊離脂肪酸において、0.05%(w/w)GC添加群で有意な減少が認められた。主たるフィトケミカル成分であるベンジルイソチオシアネート(BITC)の脂肪蓄積に及ぼす影響について、ヒト肝臓由来のHepG2細胞を用いたBITC(1~5 $\mu$ M)添加実験を行った。その結果、高濃度グルコース(4,500mg/L)含有培地群では濃度依存的な、オレイン酸(1mM)含有培地群では、2 $\mu$ M添加において脂肪蓄積抑制効果が認められた。

#### 1. はじめに

ベンジルイソチオシアネート(BITC)は、アブラナ科植物に含まれるイソチオシアネート類の一種で、マカやガーデンクレスに含まれていることが知られている。BITCは植物細胞中ではベンジルグルコシノレート(BG)と呼ばれる配糖体として存在するが、摂取後消化され、体内にはBITCとして吸収される。

イソチオシアネート類の生理作用においては、近年ブロッコリー種子あるいはブロッコリースプラウトに含まれるスルフォラファン(その配糖体であるスルフォラファングルコシノレート)に、肝臓の解毒作用を高め、肝機能マーカーであるALTや $\gamma$ -GTP値の改善効果のあることが報告されている。一方でBITCに関する類似の報告例は散見されるものの、スルフォラファンに比して少なく、十分な検証がなされていない。

本研究では、ベンジルグルコシノレートを豊富に含むガーデンクレススプラウトの摂取による健康影響について明らかにするために、実験動物にマウスを用い、ガーデンクレススプラウト乾燥粉末摂取による生理作用について検証した。加えて、本作用に関与すると考えられる主成分のフィトケミカル成分であるBITCの担う役割について細胞レベルでの検証を行った。

#### 2. ガーデンクレススプラウトの摂取に関する動物実験

##### 2.1 実験方法

##### 2.1.1 供試試料等

ガーデンクレススプラウト凍結乾燥粉末(GC)は以下の通り調製した。発芽6日目のガーデンクレススプラウト200gを-65 $^{\circ}$ Cで予備凍結した後、凍結乾燥機(FDU-1200:東京理化工業株式会社)にて16時間凍結乾燥した。乾燥した標品は、ミル(Vita-Mixアブソルートミル、大阪ケミカル株式会社)にて粉碎し、これをGCとして使用した。

飼料はオリエンタル酵母工業株式会社より購入したAIN93Gを用いた。

##### 2.1.2 BGの定量

BG標準化合物としてグルコトロペオリンカリウム(東京化成工業)を用いた。上記の操作にて得られたGC 50mgに、80%メタノール水溶液を10mL添加し、60min室温で攪拌、10 $^{\circ}$ C条件下で12,000rpmにて5min遠心分離した。その後、上清をフィルター(ポアサイズ0.45 $\mu$ m)ろ過し、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を行い、グルコトロペオリンの定量を行った。HPLCの条件は以下のとおり。

HPLCシステム: Alliance e2695 Separations Moduleおよび2998 Photodiode Array Detector(日本ウオーターズ株式会社)、カラム: Myghtysil RP-18 GP 4.6 $\phi$ ×150mm(粒径5 $\mu$ m、関東化学株式会社)、カラム温度: 40 $^{\circ}$ C、溶媒: (A) 50mMリン酸および(B) アセトニトリル、流速: 1ml/min、グラジエント条件: 0-15min (A: 95 $\rightarrow$ 92.5%、B: 5 $\rightarrow$ 7.5%)、15-16min (A92.5%、B7.5%)、16-20min (A25%、B75%)、20min (A95%、B5%)、検出波長: 234nm

\*(株)サラダコスモ 研究開発部

\*\* (株)野菜で健康研究所

\*\*\* 愛知学院大学 心身科学部

分析の結果、実験に用いたGC中のBGは、 $59.1 \pm 1.0 \text{ mg/g}$ 、BITC相当量が $21.6 \pm 0.4 \text{ mg/g}$ であった。

### 2. 1. 3 実験動物

動物実験は、神戸BMラボラトリー動物福祉委員会の承認のもと「動物の愛護及び管理に関する法律」、「動物の愛護及び管理に関する条例」、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」、および「動物の処分方法に関する指針」に準拠して行った。オスのC57BL/6Jマウス(8週齢)を日本チャールスリバー株式会社より購入して使用した。室温 $23^\circ\text{C}$ 、湿度55%の条件下で飼育した。明期は8-20時、暗期は20-8時とした。

### 2. 1. 4 動物実験

8週齢のマウスを8日間予備飼育後実験開始した。AIN93GにGCを0.01% (w/w) 添加した餌(GC0.01)および0.05% (w/w) 添加した餌(GC0.05)を用意し、これらのマウスに自由摂食させた。マウスは各群個別飼いし、1週間ごとに体重、4日間ごとに摂食量を測定した。実験開始から8週間経過後、インフルラン吸引下でマウスを屠殺し、血液採取後に肝臓を摘出し、その重量を計測した。血液は遠心分離し血漿を得た後、各評価項目を測定した(n=6)。また同様の給餌実験で、16時間の絶食後採血および肝臓を摘出したものについても同じ測定を行った(n=8)。

### 2. 1. 5 血中評価項目の定量

血糖、血中中性脂肪、血中コレステロール類の測定には、市販の測定キット(グルコースC II テストワコー、トリグリセライドE-テストワコー、コレステロールE-テストワコー、HDLコレステロールE-テストワコー、富士フィルム和光純薬製)を用いた。ALT、ASTの測定は株式会社スカイライト・バイオテックへ委託した。

### 2. 1. 6 肝脂質の定量

肝臓0.1gをホモジナイズチューブに秤取後、1M NaCl溶液を200 $\mu\text{L}$ 添加した。氷上でマイクロチューブホモジナイザー(バイオメディカルサイエンス、BC-G10)を用いて30秒間、Chr : MeOH in 0.05%BHT=2:1(v/v) (以下Chr:MeOH混液)を300 $\mu\text{L}$ 加え30秒間、更にChr : MeOH混液を400 $\mu\text{L}$ 加え30秒間ホモジナイズを行った。ボルテックス攪拌後、更にEYELA CUTE MIXER CM-1000にて $20^\circ\text{C}$ 条件下で $18 \times 100 \text{ rpm}$ で15分間攪拌した。 $10^\circ\text{C}$ 条件下で $13,000 \text{ rpm}$ で10分間遠心分離後上層を除去し、下層を新しいマイクロチューブへ移した。これに上層洗浄液(Chr : MeOH : DDW=3:48:47(v/v/v))を400 $\mu\text{L}$ 添加し、ボルテックスによる攪拌を30秒間行った後、 $10^\circ\text{C}$ 条件下で $13,000 \text{ rpm}$ で10分間遠心分離を行った。上層および中間層を可能な限り除去した上で上層洗浄液を追加、混合、遠心分離し、同様に上層および中間層を除去した。得られた下層を窒素ガス雰囲気化で乾固させた。乾固物を秤量し、総脂質量とした後、TritonX-100 : MeOH=2:1(v/v)液1mLにて溶解し、以下の測定に用いた。中性脂肪およびコレステロール類の測定には、市販の測定キット(トリグリセライドE-テストワコー、コレステロールE-テストワコー、

HDLコレステロールE-テストワコー、富士フィルム和光純薬製)を用いた。

### 2. 1. 7 統計処理

得られたデータについてDunnnettの多重比較検定を行い、危険率0.05未満のものを有意差ありと判定した。

## 2. 2 結果と考察

コントロール食あるいはGC添加食を自由摂食させ、体重に及ぼすGCの影響について評価した。その結果、GC0.01群ではコントロール群と差異は認められないものの、GC0.05群において、投与25日より有意な体重の減少が観察された(図1)。肝臓重量は、絶食前の状態では体重同様、GC0.05群では有意な減少が認められた(表1A)。一方、絶食後の状態では、両GC群共に肝臓重量に差は認められなかった(表1B)。

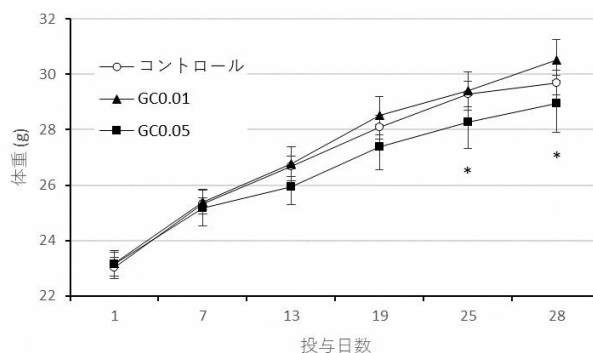


図1 実験動物(C57BL/6Jマウス)の体重変化  
コントロール:ガーデンクレス(GC)無添加群, GC0.01: GC0.01% (w/w) 添加群, GC0.05: GC0.01% (w/w) 添加群, \*:  $P < 0.05$  vs. コントロール (Dunnnett法)

絶食前に肝臓に含まれる総脂質(TL(肝臓))および中性脂肪量(TG(肝臓))においては、両GC群共に有意な減少が見られた(表1A)。絶食後に肝臓に含まれる総脂質(TL(肝臓))においては、両GC群共にコントロール群に対し有意な減少が見られたものの、中性脂肪量(TG(肝臓))に差異は見られなかった(表1B)。血液マーカーについて、絶食前では両GC群共に差が見られないものの(表1A)、絶食後では、ALT、中性脂肪(TG)および遊離脂肪酸(NEFA)において、GC0.05群とコントロール群間に有意な減少が認められた(表1B)。

肝臓は過剰に摂取された糖や脂質のようなエネルギーを中性脂肪として蓄え、絶食時にはこれを血中に放出することが知られている。本研究では、特に0.05% (w/w)のGCを添加した食餌は、肝臓において中性脂肪蓄積を抑制し、その結果、空腹時の血中中性脂肪量を低下させる効果のあることが示された。血中中性脂肪値が高値のままだと血管の老化が進み、動脈硬化から心臓疾患、脳血管疾患のリスクとなる。空腹時血中中性脂肪の測定は健康診断でも採用されており、こうしたリスクのモニタリングに有

表1 血中および肝臓中マーカー

A 絶食前					B 絶食後				
試験群		コントロール	GC0.01	GC0.05	試験群		コントロール	GC0.01	GC0.05
ALT	U/L	23.0 ± 2.4	20.1 ± 2.3	18.6 ± 1.3	ALT	U/L	20.1 ± 0.5	18.5 ± 0.4	17.5 ± 0.8**
AST	U/L	40.2 ± 2.4	42.9 ± 3.7	36.4 ± 1.7	AST	U/L	43.9 ± 0.7	42.0 ± 0.9	41.9 ± 2.6
TG	mg/dL	135.1 ± 10.8	140.1 ± 17.3	135.1 ± 10.3	TG	mg/dL	91.8 ± 4.2	80.2 ± 5.8	59.6 ± 2.0**
NEFA	mEq/L	0.89 ± 0.046	0.95 ± 0.041	1.09 ± 0.065	NEFA	mEq/L	0.819 ± 0.024	0.816 ± 0.041	0.662 ± 0.023**
TC	mg/dL	137.1 ± 9.1	118.5 ± 3.8	124.9 ± 2.7	TC	mg/dL	110.1 ± 2.7	107.9 ± 1.6	107.8 ± 1.6
HDL-C	mg/dL	85.0 ± 3.1	80.6 ± 2.2	90.0 ± 2.0	HDL-C	mg/dL	94.5 ± 2.4	93.2 ± 1.9	96.6 ± 2.2
NonHDL-C	mg/dL	45.3 ± 5.2	39.7 ± 3.2	36.5 ± 0.7	NonHDL-C	mg/dL	15.6 ± 0.9	15.7 ± 1.2	14.2 ± 1.7
BGL	mg/dL	314.7 ± 16.2	327.1 ± 16.8	301.5 ± 23.3	FBG	mg/dL	130.1 ± 5.0	128.7 ± 3.3	132.4 ± 4.1
肝臓重量	g	1.49 ± 0.075	1.41 ± 0.057	1.27 ± 0.051*	肝臓重量	g	0.97 ± 0.017	0.96 ± 0.023	0.95 ± 0.036
TL (肝臓)	mg/g	55.4 ± 3.1	47.2 ± 2.0**	42.6 ± 2.1**	TL (肝臓)	mg/g	50.0 ± 2.4	39.7 ± 2.8*	33.3 ± 2.6**
TG (肝臓)	mg/g	23.6 ± 3.1	13.1 ± 2.5**	10.0 ± 1.7**	TG (肝臓)	mg/g	12.3 ± 0.6	12.6 ± 0.7	11.4 ± 1.3

GC0.01:0.01%(w/w)ガーデンクレス添加食; GC0.05:0.05%(w/w)ガーデンクレス添加食; ALT:アラニンアミノトランスフェラーゼ; AST:アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ; TG:中性脂肪; NEFA:遊離脂肪酸; TC:総コレステロール; HDL-C:HDLコレステロール; NonHDL-C:非HDLコレステロール; FBG:血糖; TL:総脂質; \*\*P<0.01, \*P<0.05 vs. コントロール(絶食前n=6, 絶食後n=8).

用のみならず、肝臓における中性脂肪蓄積の指標としても有用であることが明らかとなった。

### 3. 中性脂肪低減効果主成分に関する細胞実験

#### 3.1 実験方法

##### 3.1.1 細胞実験

ヒト肝臓由来のHepG2細胞を用いた。10%FBS、1%ペニシリン-ストレプトマイシン、および1,500mg/Lグルコース含有D-MEM培地(富士フィルム和光純薬)にて培養後、96ウェルプレートに $1.0 \times 10^4$  cell/wellとなるよう播種し24時間培養、細胞を定着させた。低濃度グルコース(1500mg/L)培地と高濃度グルコース(4,500mg/L)培地、オレイン酸含有培地(1mMオレイン酸ナトリウム、1%BSA添加培地)を調製し、100  $\mu$ Lずつ添加した。BITCを培地中の終濃度が1~5 $\mu$ MとなるようDMSOを用いて希釈し、1 $\mu$ L添加した。48時間毎に培地交換とBITCの添加を行った。BITC添加開始5日後に細胞毒性の評価およびオイルレッドO染色による脂肪蓄積評価試験を行った。

細胞毒性の評価にはセルカウンティングキット-8(富士フィルム和光純薬製)を用いた。オイルレッドO染色は次のように行った。培地を除去しリン酸緩衝生理食塩水で1回洗浄後、10%中性緩衝ホルマリン液(富士フィルム和光純薬)で4時間固定を行った。超純水で一度洗浄し70%イソプロパノール水溶液で1分間置換した。70%イソプロパノール水溶液除去後、70%オイルレッドO溶液(isopropanol in Oil Red O : DDW=70:30(v/v))を100  $\mu$ L添加し室温下で30分間染色した。70%イソプロパノール水溶液で一度、超純水で一度洗浄後、100%イソプロパノール100 $\mu$ Lを添加し20分間インキュベートした後、マイクロプレートリーダーで492nmの吸光度を測定した。

#### 3.1.2 統計処理

得られたデータについてDunnettの多重比較検定を行い、危険率0.05未満のものを有意差ありと判定した。

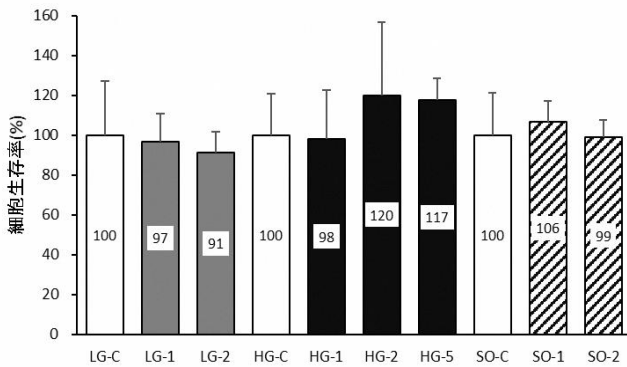
#### 3.2. 結果と考察

低濃度グルコース添加(LG)、高濃度グルコース添加(HG)、オレイン酸ナトリウム添加(SO)実験のいずれにおいても、終濃度1~2  $\mu$ M(HG実験では5  $\mu$ M)の範囲ではBITCの毒性は確認されなかった(図2パネルA)。中性脂肪の蓄積においては、LG実験では有意差はみられないものの、濃度依存的なBITCの添加による脂肪蓄積抑制効果が認められた。HG実験では、濃度依存的なBITCの添加による明らかな脂肪蓄積抑制効果が認められた。またSO実験では、2  $\mu$ MにおいてBITCの脂肪蓄積抑制効果が認められた(図2パネルB)。

細胞実験で、本研究における中性脂肪低下効果は、GCに含まれるBITCにより、肝臓でのグルコースあるいは遊離脂肪酸からの中性脂肪の合成、蓄積が抑制されることにより生じることが示された。BITCの血中濃度は最大でも3  $\mu$ Mとされており、本研究の結果はその範囲において効果が見られることから、より現実を反映したものといえる。

上記検計で添加したGC量は、ヒト換算(体重60kg)で1日あたり約8gのガーデンクレス生スプラウト、BITCの配糖体であるBGとしては約24mgを摂取する量(ヒト等価用量: HEDにて計算)に相当する。すなわち、極めて少量のBGないしはBITC摂取のみならず、常識的な量のガーデンクレス生スプラウトを摂取することでも、十分な中性脂肪低下効果が期待できることを明らかにした。

A



B

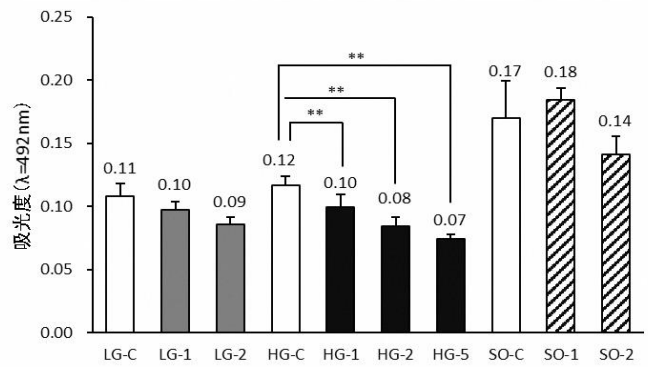


図2 ヒト肝由来細胞に対するBITCの毒性および中性脂肪の蓄積に及ぼす影響

ヒト肝由来細胞 (HepG2) を用い、MTT法による毒性評価(A)、およびオイルレッドO染色による細胞内に蓄積された脂肪の定量(B)を行った。

LG-C: 低グルコース-コントロール, LG-1: 低グルコース+1 μ M BITC, LG-2: 低グルコース+2 μ M BITC, HG-C: 高グルコース-コントロール, HG-1: 高グルコース+1 μ M BITC, HG-2: 高グルコース+2 μ M BITC, HG-5: 高グルコース+5 μ M BITC, SO-C: オレイン酸Na-コントロール, SO-1: オレイン酸Na+1 μ M BITC, SO-2: オレイン酸Na+2 μ M BITC, \*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$  vs. 各コントロール.

#### 4. まとめ

食餌における0.05% (w/w) のGC添加は、マウス肝臓における脂質の蓄積を抑制し、その結果、血中中性脂肪が低減することが示唆された。また本メカニズムとして、ガーデンクレスプラウトに含まれるBITCの肝細胞における中性脂肪蓄積抑制作用が考えられた。なお、本研究の一部を「ガーデンクレス由来成分を含む組成物及びその利用」として特許出願<sup>1)</sup>した。

#### 【参考文献】

- 1) 中田光彦ら 特願2019-222487.